

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590604

研究課題名(和文) い草染土ならびに珪藻土粉じんによるじん肺発症メカニズムの解明と障害予防

研究課題名(英文) Study on pathogenesis of pneumoconiosis by exposure to igusa-sendo and diatomite dust and its prevention

研究代表者

原田 幸一 (HARADA KOICHI)

熊本大学・大学院生命科学部・教授

研究者番号：00094029

研究成果の概要(和文)：

い草染土や珪藻土じん肺の発症メカニズムならびに修飾因子を解明するため、動物実験や環境調査をおこなった。珪藻土曝露ラットでは、肺胞洗浄液に好中球数が増加したが、マクロファージ数は、減少し、貪食した二酸化ケイ素により融解または破壊されることが考えられた。紫外線吸収剤は、実用品に添加される濃度では、感作性はみられず、日焼け止めの化粧などが、炎天下のい草栽培ほ場での日射作業の有効な対策となることがわかった。泥染処理のない草製織による畳表製造がおこなわれており、い草染土粉じん曝露対策としては、有効な対策であると解された。

研究成果の概要(英文)：

To understand pathogenic mechanism of pneumoconiosis due to igusa sendo and diatomite we performed experimental research and environmental study. Macrophage increase in number in the BALF from the animals exposed to igusa send, but it would die or decompose due to the digested diatomite in it. 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate does not provoke contact dermatitis as the usual concentration in commercial cosmetics. Not only wearing wide brimmed hat, but also making up with suntan lotion are thought to be useful measures against sunstroke in igusa planting field. During the environmental study, we find that there are some work places where they weave igusa not treated with muddy sendo soil to make tatami matt. It is understood that the weaving method is the best way to measure the igusa-send dust exposure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：じん肺、染土、珪藻土、肺胞洗浄液、感作性、発症メカニズム、粉じん環境調査。

1. 研究開始当初の背景

畳表は、収穫されたい草の香りや色調を

保つために、い草染土による泥染の工程がある。泥水に浸漬したい草を温風乾燥し、黒色ビニール袋に収納するが、その作業で、作業者は、剥離飛散する高濃度のい草染土粉じん曝露される。さらにい草の製織時に、い草から剥離した染土粉じん曝露され、じん肺の誘発が懸念される。このい草染土じん肺の発症メカニズムを解明し、予防対策を提案することを考えた。

我々は、鼻部曝露実験装置(柴田科学(株)製)を用い、い草染土をウィスター系雄性ラットに経気道曝露した。曝露後、肺胞洗浄液中の肺胞細胞像から、じん肺の発症メカニズムの解明をおこなってきた。曝露濃度の増加に伴い、肺胞洗浄液に好中球数の増加や活性化マクロファージの出現を確認することができた。また、これらの所見が、遊離ケイ酸の添加量により修飾される傾向のあることを知った。今回は、い草染土中の遊離ケイ酸や、珪藻土の二酸化ケイ素(SiO<sub>2</sub>)によるじん肺発症のメカニズムや修飾作用について、免疫生化学的見地から生体影響を解明することが目的の一つであった。

い草栽培や畳表製造現場では、粉じん濃度の高い室内環境で、長時間労働がみられる。珪藻土壁塗り作業では、壁土調整時に飛散する珪藻土粉じんや添加有機化合物に対する曝露がみられる。このような職場環境での作業に対して、環境衛生学的さらには産業保健学的見地から改善の余地があり、快適職場環境の創造に寄与することを考えた。

## 2. 研究の目的

じん肺発症メカニズムならびに修飾作用について関心を持った。遊離ケイ酸によるじん肺発症の修飾作用に対して、免疫生化学的観点から生体影響を解明することを目的の一つとした。

い草栽培では、炎天下作業時に日焼け止めである紫外線吸収剤の2-Ethylhexyl-4-methoxycinnamate (EHMC)の使用が予想されたことから、EHMCによる感作試験から基礎的情報を得ることを次の目的とした。また、い草植物体等に対する接触皮膚炎の誘発を考え、ミョウガ成分による感作実験から、基本的情報を得ることも目的とした。この感作研究は、今回の科研費研究の進展過程で解明されるべきものとして位置づけられた。

い草栽培ならびにタタミ表製造現場では、高濃度の粉じん環境で、長時間労働がみられる。珪藻土壁塗り作業では、壁土調整時に飛散する珪藻土粉じんに対する曝露がみられる(原田, 2008)。このような職場環境での作業に対して、環境衛生学的さらには産業保健学的見地から改善の余地があると考え、快適職場環境の創造に寄与することに資する

ため、環境調査の実施を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物実験

#### ① 粉じん曝露

い草染土(組合染土、JA グループ製)ならびに珪藻土(サメジマ安心珪藻土、サメジマコーポレーション製)を149 $\mu$ mの篩にかけた。これを、鼻部曝露吸入実験装置のダストフィーダーに投入後、噴霧室に固定したラットに対して経気道曝露した。対照群には、実験装置への固定のみを負荷した。

#### ② 遊離ケイ酸含有い草染土の調整

遊離ケイ酸(SIGMA CHEMICAL)はい草染土(遊離ケイ酸含有率13.4%)に加え所定の遊離ケイ酸濃度に調整した。

#### ③ 肺胞細胞の回収

エーテル深麻酔下でラット気管支をカニューレーションし、生理食塩水を用い、5mlの肺胞洗浄液を回収した。これを生理食塩水にて2回洗浄後、集細胞遠心装置(SHANDON JEOL)にて、肺胞細胞をスライドグラス(スーパーフロストイエロー MATSUNAMI)に回収した。これをディフ・クイック液(シスメック)にて染色し顕微鏡下にてマクロファージ、好中球、リンパ球等を観察算定した。

#### ④ 肺胞洗浄液中リゾチーム活性測定

比濁法にて測定した。結晶卵白リゾチーム(MERCK)を1/15Mリン酸緩衝液(pH6.6)に加え5, 10, 15 $\mu$ g/mlの標準液を調整した。

*Micrococcus luteus* (和光純薬工業)の120mgを1/15Mリン酸緩衝液500mlに懸濁させ浸透し氷室に保存し基質液とした。ラット肺胞洗浄液を試験管に50 $\mu$ l採取し、37 $^{\circ}$ Cで保温した。次に試験管に基質液を3mlずつ加えてミキサーで混和した後、37 $^{\circ}$ Cで10分間加温しミキサーにて再度混和したのち、600nmで吸光度を測定した。盲検として1/15Mリン酸緩衝液を用いた。吸光度から検量線を作成し、試料中のリゾチーム濃度を算出した。

#### ⑤ 肺胞洗浄液TNF- $\alpha$ 濃度の測定

ラット肺胞洗浄液を用い、ELISA法(Rat TNF- $\alpha$  Ultrasensitive: Biosource製)にておこなった。

#### ⑥ 肺胞洗浄液蛋白濃度の測定

ラット肺胞洗浄液中の蛋白濃度は、Lowry法にて定量した。

#### ⑦ $\beta$ -phellandreneの合成

ミョウガ成分一つである $\beta$ -phellandreneの合成は、熊本大学医学薬学部生体機能分子合成学分野にておこなった。

#### ⑧ 一次皮膚刺激作用

ハートレー系雌性白色モルモットの腹部を剃毛し、 $\beta$ -phellandrene-dimethyl sulfoxide (DMSO)ならびに、EHMC-DMSO溶液をFINN CHAMBER (EPITEST Ltd Oy)上のろ紙に20 $\mu$ l吸収させ、閉鎖貼付した。さらに、

SILKYTEX（東京衛材研究所）及びユーロクバン（祐徳薬品工業）で貼付を補強した。24時間後、剥離時の皮膚の所見と、剥離後、24時間後の皮膚所見を観察した。対照群には、DMSO溶液を同様に用いた。

⑨  $\beta$ -phellandrene の感作性試験

Murine local lymphnode assay (LLNA) 法 (NIH Publication number 09-7357) にておこなった。

⑩ EPMC の感作性試験

Magunuson と Kligman の guinea-pig maximization test (GPMT) 法に従って、おこなった。

(2) 環境調査

① 気中浮遊粉じん濃度測定

労研個人サンプラーPS-33型（柴田科学製）を作業場内と屋外に設置し、浮遊粉じん濃度を測定した。

② 調査票の作成

「粉じん作業環境調査」を熊本大学大学院生命科学研究部等疫学研究倫理委員会への申請し、許可を受けた（許可期間：平成22年11月4日から平成24年3月31日）。この調査票（後掲）をもとに、粉じん作業環境調査を行った。

粉じん作業環境調査

調査対象者

氏名 ( )  
住所 ( )  
電話 ( )  
e-mail ( )  
性 男、女 年齢 ( ) 歳  
職業 ( )  
事業規模（自己申告） 大規模、 中規模、  
小規模、その他 ( )  
従業者数 ( ) 人

以下の質問にお答えください。

1. 作業で取り扱う粉じんは、何ですか。  
粉じんの名称 ( )
2. 作業をするうえで、その粉じんの使用を止めることを検討しましたか。該当番号を選んでください。  
1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )
3. 粉じん発生源の密閉はおこなっていますか。該当番号を選んでください。  
1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )
4. 局所排気装置の設置はおこなっていますか。該当番号を選んでください。  
1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )

5. 全体換気装置の設置はおこなっていますか。該当番号を選んでください。

1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )

6. 関係者以外の作業場への立ち入り制限はおこなっていますか。該当番号を選んでください。

1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )

7. 休憩室で休憩をおこなっていますか。該当番号を選んでください。

1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )

8. 粉じん測定をおこなっていますか。該当番号を選んでください。

1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )

9. 6ヶ月以内ごとに1回、定期的に測定をおこなっていますか。該当番号を選んでください。

1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )

10. 測定記録は保存されていますか。該当番号を選んでください。

1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )

11. 外部測定機関へ測定を依頼していますか。該当番号を選んでください。

1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )

12. 局所排気装置の自主検査をおこなっていますか。該当番号を選んでください。

1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )

13. 除じん装置に対して始業時の点検をおこなっていますか。該当番号を選んでください。

1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )

14. 粉じん作業について講習会に出席していますか。該当番号を選んでください。

1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )

15. 作業者に粉じん作業について、注意点（マスクの装着）などを教えていますか。該当番号を選んでください。

1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )

16. 作業場の清掃はおこなっていますか。該当番号を選んでください。

1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )

17. たい積粉じんの除去をおこなっていますか。

- か。該当番号を選んでください。
- 1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )
  18. 原材料の粉体管理（飛散防止等）をおこなっていますか。該当番号を選んでください。
    - 1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )
  19. 粉じん作業時にマスクの着用をおこなっていますか。該当番号を選んでください。
    - 1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )
  20. 粉じんマスクを顔面にフィットさせていますか。該当番号を選んでください。
    - 1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )
  21. 可燃性粉じんの使用時に爆発防止の措置をおこなっていますか。該当番号を選んでください。
    - 1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )
  22. 作業場周辺（屋外）の粉じん対策をおこなっていますか。該当番号を選んでください。
    - 1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )
  23. マスク以外の個人保護具（手袋、耳栓、ゴーグル、専用作業着など）の使用状況を教えてください。
 

保護具の名称 ( )
  24. 第三者による職場点検などをおこなっていますか。該当番号を選んでください。
    - 1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )
  25. 定期健康診断の受診をおこなっていますか。該当番号を選んでください。
    - 1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )
  26. じん肺健康診断の受診をおこなっていますか。該当番号を選んでください。
    - 1) おこなっている、2) おこなっていない、3) その他 ( )
  27. 粉じん作業に関する健康上の指摘を受けたことがありますか。該当番号を選んでください。
    - 1) 受けたことがある、2) 受けたことはない、3) その他 ( )
  28. 自覚症はありますか。該当番号を選んでください。
    - 1) ある（症状 ( )）、2) ない、3) その他 ( )
  29. 喫煙状況をお尋ねします。
    - 1) タバコを吸っている。（1日 本程度）

- 2) タバコを吸っていた。（やめてからの禁煙歴 年）
  - 3) その他 ( )
30. 作業している粉じん作業場の全体についてどのように考えますか。
- 1) 満足している、2) やや満足している、3) やや不満である、4) 不満である
- そのように考える理由はなんですか ( )

自由記載

快適作業環境を創造するうえで、役に立つことがあれば教えてください。その他、調査に関して要望などがあれば、教えてください。

ご協力ありがとうございました。

#### 4. 研究成果

##### (1) 珪藻土曝露実験

珪藻土曝露群の肺胞洗浄液中では好中球数は用量依存的に増加したが、マクロファージ数は、減少傾向であった（図1，2）。

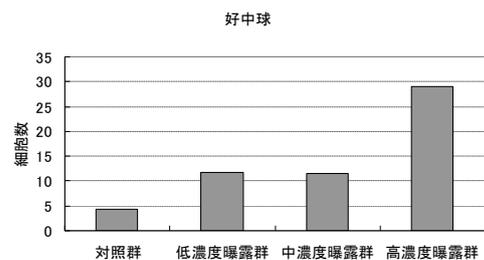


図1. 肺胞好中球と珪藻土曝露濃度の関係

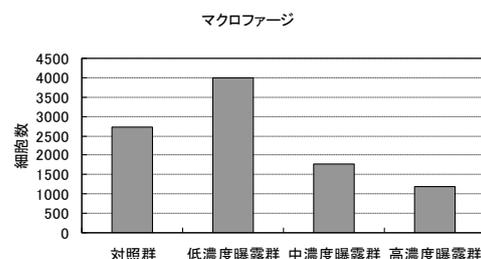
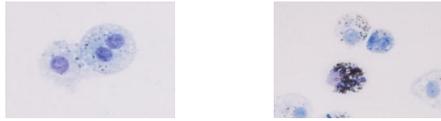


図2. 肺胞マクロファージと珪藻土曝露濃度

(好中球数/マクロファージ数)比は珪藻土暴露濃度の増加に伴い増加した。これは、珪藻土を食食したマクロファージ（図3）が壊れ、一方で、好中球数が増加し、(好中球数/マクロファージ数)比が大きくなったものと考えられた。マクロファージや好中球は異物の生体侵入の際にみられる急性炎症反応の生体指標であり、(好中球数/マクロファージ数)比の増加傾向や多核マクロファージの出現は、珪藻土を異物として認識し、急性炎症反応を示したためであると考えられた（図3）。



多核マクロファージ 珪藻土貪食マクロファージ  
図3. 肺胞洗浄液中のマクロファージ

肺胞洗浄液中のリゾチーム濃度を蛋白濃度で除した値で各群を比較したが、有意差はみられなかった。い草染土中遊離ケイ酸が、肺胞洗浄液中のリゾチーム濃度を上昇させたことが報告されているが、珪藻土曝露実験では、観察されなかった。

TNF- $\alpha$ 濃度も、リゾチーム濃度同様、蛋白濃度で除した値で各群を比較したが、有意差はみられなかった。TNF- $\alpha$ は無機粉塵による珪肺や、精糖業の現場で観察される有機粉塵によるバガス肺では著明に上昇するが、今回の珪藻土短期曝露では変化が見られなかった。

先行研究でおこなわれたい草染土曝露実験と今回の珪藻土曝露実験の結果の違いとして、粉塵中に存在する二酸化ケイ素の存在形態や、粉塵曝露濃度などに原因があると考えられた。い草染土中二酸化ケイ素は、結晶性の $\alpha$ シリカの形態であるが、珪藻土の二酸化ケイ素は、珪藻の骨格を形成するものであり、その存在形態が異なっている。これが、い草染土塵肺と珪藻土肺の発生メカニズムの違いとなっていると考えられる。また、粉塵粒径分布や粉塵の長軸性の違いなどいくつかの課題があり、珪藻土粉塵の呼吸器への影響の本態の解明に関してはさらなる検討が必要である。

## (2)感作性実験

### ①一次皮膚刺激作用

$\beta$ -phellandrene は 0.8%以下では一次皮膚刺激作用はみられなかったが、4%以上で一次皮膚刺激作用を起こすことがわかった。

EHMC は 5%以下では一次皮膚刺激作用はみられなかったが、10%以上で一次皮膚刺激作用を起こすことがわかった。

### ②感作試験

$\beta$ -phellandrene に対する LLNA 試験では、EC3(%)は、0.54%であり、 $\beta$ -phellandrene の感作性が確認できた(表1)(Q. J. Wei, 2010)。

EHMC による GPMT 試験では、50%-4-メトキシケイヒ酸 2-エチルヘキシル DMSO 溶液を誘導処置に用い、5%-4-メトキシケイヒ酸 2-エチルヘキシル DMSO 溶液を惹起処置に用いたところ、66.7%の陽性率であった(表2)。

表1. Local lymph node assay

Chemical	Exposure Concentration (%)	dpm/n ode	SI	EC3%
$\beta$ -phellandrene	0	75	1	0.54
	0.1	101	1.35	
	1	353.5	4.71	
	5	655	8.73	

表2. Allergenicity of

2-Ethylhexyl-4-methoxycinnamate (EHMC) in the GPMT

Induction material	Challenge material	Challenge results
50%EHMC	5%EHMC	6/9
50%EHMC	DMSO	0/9
DMSO	5%EHMC	0/9
DMSO	DMSO	0/9

Erythema observed at 24 hours after the application

## (3)環境調査

### ①作業環境中浮遊粉じん濃度

染土処理い草を製織する某作業場の浮遊粉じん濃度は、8.16 mg/m<sup>3</sup>であり、その時の屋外は、1.82 mg/m<sup>3</sup>であった。染土処理のない草を製織する某作業場では、0.199 mg/m<sup>3</sup>であり、その時の外気濃度は、0.300 mg/m<sup>3</sup>であった。泥染め処理のない乾燥い草を製織する作業場では、浮遊粉じん濃度は低かった。このことは、粉じん環境改善の一つとして、泥染工程を省く、い草の製織製法が提案される。

### ②粉じん環境調査

粉じん作業として、珪藻土の壁塗り作業、千切り大根乾燥作業、染土処理い草製織作業について、前掲した調査票により、面接調査した。今回の調査対象作業場は、小規模経営であり、粉じん対策については、特記することはなく、開放系での作業や、マスク装着による対応が主なものであった。いずれの被調査者も曝露粉じんによる自覚症を訴えることはなかった。

## (3)結果のまとめ

珪藻土の主成分は、二酸化ケイ素(SiO<sub>2</sub>)であり、遊離ケイ酸と同じ化学式をもつ。い草染土実験と同様の曝露実験をおこなったところ、珪藻土の場合は、曝露濃度と好中球数が比例したが、マクロファージ数が減少していた。マクロファージは、貪食した二酸化ケイ素により融解または破壊されることが考えられる。免疫反応として、リンパ球数やリゾチーム活性そしてTNF- $\alpha$ をみたが、変化の傾向がみられるが、い草染土中遊離ケイ酸濃度や珪藻土曝露濃度との間に有意差はみられなかった。これは、肺胞洗浄液採取の均一性に

問題のあることが考えられた。

い草栽培では、収穫期が6-7月であり、作業場での粉じん作業に加え、植物生体との皮膚接触や屋外での高温かつ炎天下の作業となる。ミョウガ成分である $\beta$ -phellandreneによる感作性接触皮膚炎が確認できたことは、同じ植物であるい草への接触を考えると、直接接触を防ぐため、作業衣による防護対策を考える必要がある。炎天下では、紫外線吸収剤(日焼け止め)の使用が考えられた。今回は、繁用されている紫外線吸収剤であるEHMCの感作性試験をおこなった。動物実験では高濃度塗布群には、感作作用がみられたが、実用品に添加される濃度では、感作性はみられなかった。このことは、長帽の着用に加え、紫外線吸収剤の化粧などが、炎天下の日射作業の有効な対策の一つとなることがわかった。

粉じん環境調査では、千切り大根乾燥作業では、マスクなどの防護具の着用はなかった。開放系での短時間作業であることから、粉じん環境であることを認識していないことが窺われた。珪藻土塗り壁作業では、粉じんの飛散が、珪藻土の懸濁処理に時にみられるが、懸濁容器内でみられる程度であり、高濃度の粉じん曝露作業ではなかった。い草製織作業場では、総粉じん濃度が、許容濃度(第1種粉じん $2\text{ mg/m}^3$ )を超えていたが、作業者は、織機周辺で常時作業するのではなく、点検的作業であった。また、個人サンプラーによる粉じん濃度測定であり、基準法ではないことから、参考値であるが、作業者は、呼吸器を介しての粉じん曝露には、注意すべきであることが判明した。快適作業環境創造のため、作業時間、個人防護具の着用、織機周辺の粉じん対策等が、模索されねばならない。調査の過程で泥染処理のない、乾燥い草の製織による畳表製造がおこなわれていることを知った。当作業場内粉じん濃度は、屋外と変わらなかった。この作業法は、い草染土粉じん曝露対策としては、有効な対策法の一つであると解された。以上の結果を踏まえ、快適・健康な作業環境の創造に向けた研究の展開が、今後必要であること考えた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Q. J. Wei, C. N. Wei, K. Harada, K. Minamoto, Y. Okamoto, M. Otsuka, and A. Ueda, Evaluation of allergenicity of constitution of *myoga* using the murine local lymph node assay, International Journal of immunopathology and pharmacology, (査読有) Vol. 23(2):463-470, 2010.

② 原田幸一、魏長年、原邦夫、野田耕右、長

谷川麻子、松下修、野口ゆかり、韋慶軍、大森昭子、皆本景子、上田厚、シックハウス症候群に対する環境医学的アプローチ、職業・環境アレルギー、(査読無) 15(2):12-23, 2008.

[学会発表] (計1件)

① 原田幸一、松下修、魏長年、皆本景子、吉田倫子、上田厚、原邦夫、森美穂子、室内ホルムアルデヒド濃度におよぼす珪藻土塗り壁の影響 平成20年度室内環境学会総会、平成20年12月1日、(タワーホール船堀)

[その他] (計2件)

卒業研究報告集

① 浦川加奈子、的野千裕、皆本景子、魏長年、上田厚、原田幸一、ミョウガ栽培者に観察される接触性皮膚炎の発症メカニズム、卒業研究報告書、第3期生平成21年度年度版、pp1-4、熊本大学医学部保健学科検査技術科学専攻

② 本村望美、山口麻衣、上田厚、原田幸一、珪藻土粉塵によるラット呼吸器炎症反応の研究、卒業研究報告集、第2期生平成20年度版、pp31-34、熊本大学医学部保健学科検査技術科学専攻

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

原田 幸一 (HARADA KOICHI)

熊本大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号：00094029

##### (2) 研究分担者

① 魏 長年 (WEI CHAN-NIAN)

熊本大学・大学院生命科学研究所・准教授

研究者番号：00363523

② 皆本 景子 (MINAMOTO KEIKO)

熊本大学・大学院生命科学研究所・助教

研究者番号：00381012

③ 上田 厚 (UEDA ATSUSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究所・

名誉教授

研究者番号：10040198